

Jarkko Larkio

Rasvanpoisto siemenistä ravintokuituanalytiikkaa varten

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

24.11.2015

Tekijä(t) Otsikko	Jarkko Larkio Rasvanpoisto siemenistä ravintokuituanalytiikkaa varten
Sivumäärä Aika	28 sivua + 3 liitettä 24.11.2015
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Kemiallinen analytiikka
Ohjaaja(t)	ETT, Helena Pastell Lehtori, Kari Raatikainen
<p>Opinnäytetyö tehtiin Elintarviketurvallisuusvirasto Evirassa, Kemian ja toksikologian tutkimusyksikössä, Koostumus ja laatuindikaattorit -jaostossa.</p> <p>Työn tarkoituksena oli optimoida rasvanpoisto siemenistä niin, että niiden rasvapitoisuus saataisiin alle 10 %. Samalla tarkoitus oli laajentaa ravintokuidun määritysmenetelmä siemennäytteille, joiden rasvapitoisuus on suuri. Kyseistä menetelmää käytettäisiin esikäsittelynä näytteille, jotka sisältävät yli 10 % rasvaa.</p> <p>Rasvanpoistomenetelmän kehityksessä käytettiin vanhemman ravintokuitumenetelmän ohjetta (AOAC 985.29), jossa rasva uutettiin petrolieetterillä. Apuna käytettiin myös Eviran omaa menetelmää voituotteiden rasvanmääritykseen. Menetelmässä rasva uutettiin petrolieetterillä ja kerättiin rasvankeräysastialle. Liuottimen annettiin haihtua, jonka jälkeen astia punnittiin. Menetelmän kehityksessä kokeiltiin eri liuotinmääriä ja uuttoaikoja.</p> <p>Ravintokuituanalyysi suoritettiin Eviran menetelmän ”Kokonaisravintokuitupitoisuuden määrittäminen vilja- ja kasvisnäytteistä entsymaattis-gravimetrisesti ja HPLCmenetelmällä” mukaan. Analyysissä näytteestä pilkottiin ensin entsymaattisesti proteiinit ja tärkkelys. Tämän jälkeen analysoitiin gravimetrisesti pitkäketjuinen veteen liukenematon ravintokuitu ja pitkäketjuinen vesiliukoinen, mutta etanolilla saostuva ravintokuitu. Lyhytketjuiset vesiliukoiset ravintokuidut analysoitiin HPLC-laitella.</p> <p>Opinnäytetyön tuloksena saatiin yksinkertainen esikäsittely ravintokuituanalyysiin rasvaisille näytteille. Rasvanpoistossa ei päästy aivan alle 10 %:n, mutta esimerkiksi uuttoaikojalla se saadaan vielä alemmaksi.</p>	
Avainsanat	Ravintokuitu, rasva, uutto

Author(s) Title Number of Pages Date	Jarkko Larkio Fat extraction from seeds in dietary fibre analytics 28 pages + 3 appendices 24. November 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	Chemical Analytics
Instructor(s)	Helena Pastell Kari Raatikainen
<p>The Bachelor's thesis was conducted in Finland's Food Safety Authority, Evira.</p> <p>The goal of the project was to optimize a fat extraction method for seeds, so that their fat concentration could be brought down below 10 %. The goal was also to expand the dietary fibre protocol to include seed samples, which fat concentration is very high. The extraction method would be used before the dietary fibre analysis on samples with fat concentrations higher than 10 %.</p> <p>An older dietary fibre analysis method (AOAC 985.29), in which the fat was extracted with petroleum ether, was used as a basis for the development of the fat extraction method. The fat was extracted with petroleum ether with shaking. The sample was then centrifuged and the petroleum ether was gathered on a beaker. The solvent was then evaporated from the beaker, and the beaker was weighed. Different extraction times were tried during the development of the method.</p> <p>The total dietary fibre analysis was conducted according to Evira's method "Total dietary fibre analysis on grain and plant samples using enzymatic-gravimetric and HPLC methods". Sample's proteins and starch were digested with enzymes and the insoluble and soluble dietary fibre were analyzed gravimetrically. Low molecular weight dietary fibre were analyzed using a HPLC with RI detector.</p> <p>The results obtained from the project show that the fat extraction could be used as a pre-treatment for samples with high fat concentration. The developed method was not able to get the fat concentration below 10 %, but with more extraction it should be possible.</p>	
Keywords	dietary fibre, fat, extraction

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Ravintokuidut	1
2.1	Ravintokuitujen analysointi	3
2.2	Entsyymikäsittely	4
3	Rasvaiset näytteet ravintokuituanalytiikassa	5
3.1	Rasva siemenissä	6
3.2	Rasvan uutto siemenistä	8
4	Kokeellinen osuus	9
4.1	Näytteiden esikäsittely	9
4.2	Rasvanpoistomenetelmän kehitys	10
4.2.1	Rasvanpoistomenetelmän validointi	12
4.2.2	Tulokset	12
4.3	Kokonaisravintokuitupitoisuuden määrittäminen	17
4.3.1	Reagenssit ja laitteet	17
4.3.2	Analyysin kulku	19
4.3.3	Tulosten laskeminen	22
4.3.4	Ravintokuituanalyysin tulokset	23
5	Yhteenveto	26
	Lähteet	27

Lyhenteet

IDF	Insoluble dietary fibre = Veteen liukenematon ravintokuitu
SDFP	Dietary fibre soluble in water but precipitated in aqueous ethanol = Veteen liukeneva, mutta etanolissa saostuva ravintokuitu
SDFS	Dietary fibre soluble in water but not precipitated in aqueous ethanol = Veteen liukeneva ja etanolissa saostumaton ravintokuitu
RS	Resistant starch = resistentti tärkkelys

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Elintarviketurvallisuusvirasto Evirassa, kemian ja toksikologian tutkimusyksikössä, koostumus ja laatuindikaattorit -jaostossa. Opinnäytetyö oli osa ravintokuituanalytiikkaa. Menetelmä on aikaisemmin validoitu Evirassa kasvi- ja viljanäytteille. Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli laajentaa kyseisen menetelmän analysoitavat näytteet sisältämään yli 10 % rasvaa sisältävät näytteet. Opinnäytetyö suoritettiin 2015 keväällä ja kesällä.

Opinnäytetyön tavoite oli kehittää ja validoida rasvanpoistomenetelmä näytteille, joissa on yli 10 % rasvaa. Kyseinen menetelmä lisättäisiin ravintokuituanalyysiin esikäsittelyksi rasvaisille näytteille. Ravintokuituanalyysissä käytettiin validoitua menetelmää ”Kokonaisravintokuitupitoisuuden määrittäminen vilja- ja kasvisnäytteistä entsymaattis-gravimetrisesti ja HPLC-menetelmällä”. Näytteiksi rasvanpoistomenetelmän kehitykseen valittiin siemenet kahdesta syystä: niiden rasvaprosentti on korkea, ja ne sisältävät runsaasti ravintokuitua.

Rasvanpoistomenetelmän kehityksessä käytettiin pohjana vanhempaa ravintokuituanalyysimenetelmää AOAC 985.29, jossa rasva uutettiin petroleetterillä. Apuna käytettiin myös Eviran menetelmää, jolla määritetään rasvapitoisuutta voituotteista. Menetelmää kehitettiin kokeilemalla eri uuttoaikoja, -määriä ja -tyylejä.

2 Ravintokuidut

Ravintokuituja pidetään yleisesti tärkeänä osana ihmisten ruokavaliota niiden monien hyötyjen takia. Ne estävät esimerkiksi ummetusta, diabetesta, liikalihavuutta ja sydänsairauksia. Niiden suositeltu päivittäinen saanti on n. 35 g päivässä miehellä ja 25 g naisella [9]. Tästä syystä on tärkeää, että ravintokuitujen pitoisuudet saadaan tarkasti määritettyä kaikista elintarvikkeista. Vuonna 2008 Codex Commission on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses (CCNFSDU) määrittivät ravintokuidut seuraavasti: ”Ravintokuidulla tarkoitetaan hiilihydraattipolymeerejä (a), jotka koostuvat kymmenestä tai useammasta monomeerisestä yksiköstä (b), jotka eivät hydrolysoidu ihmisen ohutsuolessa ruuansulatusentsyymien vaikutuksesta ja kuuluvat seuraaviin kategorioihin:

Ruoassa luontaisesti esiintyvät syötävät hiilihydraattipolymeerit. Hiilihydraattipolymeerit, jotka on saatu ruoan raaka-aineista fysikaalisilla, entsymaattisilla tai kemiallisilla menetelmillä, joilla on toimivaltaisten viranomaisten hyväksymiä tieteellisesti todistettuja terveyttä fysiologisesti edistäviä vaikutuksia; synteettisiä hiilihydraattipolymeerejä, joilla on toimivaltaisten viranomaisten hyväksymiä tieteellisesti todistettuja terveyttä fysiologisesti edistäviä vaikutuksia. Kasviperäinen ravintokuitu saa sisältää ligniinijakeita ja/tai muita yhdisteitä, jos ne liittyvät polysakkarideihin kasvien soluseinissä, ja jos ne voidaan kvantitoida AOAC:n gravimetrisellä analyttisellä ravintokuitumenetelmällä: ligniinijakeet ja muut yhdisteet (proteiini, fenoliset yhdisteet, vahat, saponiinit, fytaatit, kutiinit, fytosterolit yms.), jotka ovat läheisesti ”tekemisissä kasvien polysakkaridien kanssa menetelmässä AOAC 991.43.” Kansallisten viranomaisten saivat kuitenkin päättää, kuuluvatko 3-9 monosakkaridisyksikköä sisältävät hiilihydraatit ravintokuituihin. Esimerkiksi Euroopan unioni luokittelee ravintokuiduiksi myös hiilihydraatit, joissa on vähintään 3 monosakkaridisyksikköä [1].

Kuituja on luokiteltu monella eri tavalla. Ne voidaan jakaa veteen liukenemattomiin ravintokuituihin (IDF), vesiliukoisiin mutta etanolilla saostuviin ravintokuituihin (SDFP) ja lyhytketjuisiin vesiliukoisiin ravintokuituihin (SDFS). Ravintokuidut voidaan luokitella myös yksinkertaisemmin, mikäli halutaan puhua niiden terveysvaikutuksista. Esimerkiksi Cyril WE Kendall, Amin Esfahani ja David JA Jenkinsin kirjoittamassa artikkelissa ”The link between dietary fibre and human health” ravintokuidut on jaoteltu viskooseihin ja kiinteisiin ravintokuituihin. [2.]

Suurin osa ravintokuitujen terveysvaikutuksista on huomattu tulevan viskooseista ravintokuiduista. Nämä ravintokuidut tekevät ohutsuolessa viskoosin geelin, joka hidastaa ravinnon imeytymistä ja vatsan tyhjenemistä. Näin ollen vatsa pysyy täydempänä pidemmän aikaa. Ravinnon hidastunut imeytyminen hidastaa myös glukoosin imeytymistä, joka tasoittaa veren sokeriarvojen vaihtelua. Tästä syystä viskooseilla ravintokuiduilla on huomattu olevan suuri apu 2. tyypin diabeteksen estämisessä ja hallinnassa. Viskooseilla ravintokuiduilla on myös huomattu olevan yhteys veren kolesteroliarvojen alenemiseen. [2.]

Vastaavasti kiinteästä ravintokuidusta on ristiriitaisia tutkimuksia. Useimmissa kliinisissä tutkimuksissa niillä ei ole huomattu olevan vaikutusta glukoosi- ja lipidi-

metaboliassa, mutta väestötutkimuksissa on taas huomattu niiden auttavan diabeteksen ja sepelvaltimotaudin ehkäisemisessä. [2.]

Ravintokuituihin kuuluu monia eri komponentteja, joiden vaikutukset ihmiskehossa vaihtelevat suuresti. Suurin osa ravintokuiduista kuitenkin auttaa erityisesti painonhallinnassa, koska ravintokuiduista saadaan vain vähän energiaa (2 kcal/g). Ne myös lisäävät ulosteen määrää ja näin ollen auttavat ummetuksen hoidossa. Nykyään monet tuotteet on valmistettu hyvin prosessoiduista jyvistä. Tällä keinolla saadaan tuotteiden säilymisaika pidemmäksi, mutta samalla tuotteista katoavat ravintokuidut. Tämä on johtanut siihen, että nykyaikana ihmisen ruokavalioon ei kuulu tarpeeksi ravintokuituja. Esimerkkejä eri ravintokuiduista on listattu taulukkoon 1.

Taulukko 1. Esimerkkejä ravintokuiduista ja niiden käytöstä. [10.]

Ravintokuitu	Käyttö	Saatavuus
Pektiini	Parantaa gealien muodostumista Lisää viskoosia juomissa	Eristetään kasveista
Arabikumi	Prebiootti Sokerin korvike	Eristetään akasiapuun oksista ja rungosta
Fruktaani	Prebiootti Rasvan korvike Sokerin korvike Tärkkelyksen korvike	Eristetään kasveista kuten sikuri ja maa-artisokka
Guarkumi	Sakeuttamisaine	Eristetään guar-kasvin <i>Cyamopsis tetragonoloba</i> siemenistä

2.1 Ravintokuitujen analysointi

Ravintokuidut ovat hiilihydraatteja, joissa monosakkaridit ovat liittyneet toisiinsa glykosididoksilla. Erilaiset ravintokuidut eroavat toisistaan rakenneyksikköjensä, kokonsa ja haaroittuneisuutensa suhteen. Tästä syystä ei voida käyttää vain yhtä menetelmää

kaikkien ravintokuitujen määrittäisiin. Samalla on syntynyt keskustelua siitä, onko tärkeämpää ensin päättää yleinen määritelmä ravintokuiduille, jonka mukaan kehitettäisiin analysointimenetelmä; vai ko menetelmä, jonka mukaan saataisiin yleinen määritelmä ravintokuiduille. Ravintokuitujen analysointiin on kehitetty monia menetelmiä, joilla voidaan analysoida tietynlaisia ravintokuituja, ja menetelmiä, joita käytetään mahdollisimman laaja-alaisesti erilaisten ravintokuitujen analysoimiseksi.

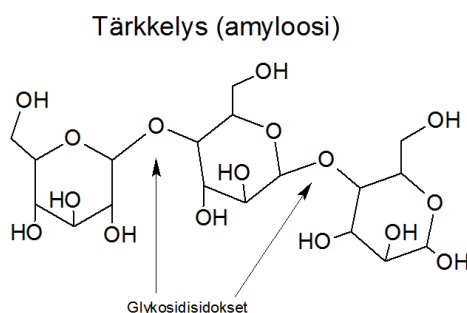
AOAC 985.29 ja AOAC 991.43 ovat laajalti käytetyt viralliset menetelmät ravintokuitujen laaja-alaiseen analysointiin elintarvikkeista. Kyseiset menetelmät eivät kuitenkaan ole riittäviä kaikkien ravintokuiduksi laskettavien komponenttien määrittämiseen. Vuonna 2007 McCleary kehitti menetelmän, jossa oli yhdistetty oligosakkaridien ja polysakkaridien määrittäminen. Kyseisestä menetelmästä on nykyään kaksi versiota: AOAC 2009.01 ja AOAC 2011.25. AOAC 2009.01 on tarkoitettu kokonaisravintokuidun määrittämiseen. AOAC 2011.25 taas on tarkoitettu samaan tarkoitukseen, mutta sillä voidaan myös erottaa veteen liukenematon ja vesiliukoinen polysakkaridifraktio toisistaan. Tätä menetelmää pidetään kattavana, koska sillä voidaan analysoida kaikki Codex Alimentarius Commissionin ravintokuitumääritelmään kuuluvat ravintokuidut. Kyseisessä menetelmässä ravintokuidut jaetaan kolmeen osaan: veteen liukenematon ravintokuitu (IDF), veteen liukeneva ja etanolissa saostuva ravintokuitu (SDFP) ja vesiliukoinen ja ei etanolilla saostuva ravintokuitu (SDFS). Uuden määritelmän mukaisesti myös lyhytketjuiset oligosakkaridit luokitellaan ravintokuiduksi ja ne voidaan analysoida uusilla menetelmillä. [1.]

AOAC 2011.25 -menetelmässä määritetään IDF ja SDFP gravimetrisesti entsyymikäsittelyn jälkeen. Entsyymikäsittely vastaa ihmisen ohutsuolessa tapahtuvaa hajotusprosessia, ja sillä hajotetaan tärkkelys D-glukoosiksi, maltoosiksi ja maltodekstriineiksi (jotka myöhemmin hajotetaan ennen HPLC analyysiä). Veteen liukenemattoman ja vesiliukoisen ravintokuidun määrittämisen jälkeen lyhytketjuiset vesiliukoiset ravintokuidut määritetään nestekromatografilla. [3.]

2.2 Entsyymikäsittely

Amylaasi on entsyymi, joka pilkkoo pitkien polysakkaridien alpha-glykosididoksia, joita on esimerkiksi tärkkelyksessä. Polysakkaridit hydrolysoituvat sokereiksi, kuten

maltoosi, dekstriini ja glukoosi. Amylaasin yleisin muoto nisäkkäissä on α -amylaasi, ja sitä tuotetaan sylkirauhasissa ja haimassa. Syljessä α -amylaasin vaikutus on tosin olematon, koska ruoka ehtii viipyä niin vähän aikaa suussa ja vatsan hapot tekevät amylaasin tehottomaksi (α -amylaasin optimi pH on 6,7 - 7,0). Haimassa α -amylaasi erittyy rauhas soluista haiman sekreettiin, joka taas erittyy ohutsuolen alkuosaan. Ohutsuolessa polysakkaridit kuten tärkkelys, paitsi resistentti tärkkelys, pilkkoutuvat α -amylaasin toimesta. Amylaasi ei tosin pilko kaikkia polysakkarideja, vaan on spesifinen ja toimii vain tiettyihin rakenteisiin. Amylaasi toimii rikkomalla satunnaisesti glykosididoksia glukoosien välillä poly- ja oligosakkarideissa. Haiman α -amylaasi kykenee vain hydrolysoimaan 1,4- α -D-glukosididoksia molekyylin sisällä (kuva 2).

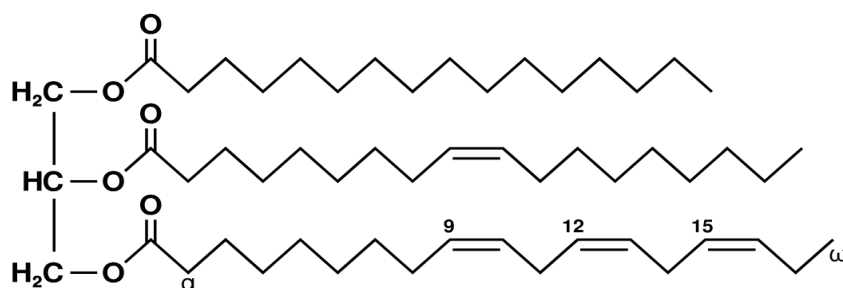


Kuva 1. Lineaarisen tärkkelyksen rakenne (amyloosi) ja siinä olevat glykosididokset

Amyloglykosidaasi on toinen entsyymi, jota löytyy ohutsuolesta. Kyseinen entsyymi toimii yhdessä α -amylaasin kanssa ja pilkkoo glukosididoksia. Amyloglukosidaasi pystyy pilkkomaan myös haarautuvien tärkkelysten 1,6-glukosididoksia ja irrottamaan glukoosimolekyyliä polysakkaridiketjujen päistä. [4.] Proteaasit ovat entsyymejä, jotka pilkkovat proteiineja hydrolysoimalla proteiinin aminohappojen välisiä peptididoksia.

3 Rasvaiset näytteet ravintokuituanalytiikassa

Ravintorasvoista suurin osa koostuu triglyserideistä, joissa glyserolimolekyyliin on kiinnittynyt kolme rasvahappoketjua. Rasvahappoketjujen pituus voi vaihdella eri triglyseridien välillä. Triglyseridit ovat rakenteensa vuoksi poolittomia, ja näin ollen liukenevat huonosti veteen. Toisaalta ne liukenevat hyvin poolittomiin orgaanisiin liuottimiin kuten heksaani ja petroleetteri.



Kuva 2. Triglyseridien rakenne

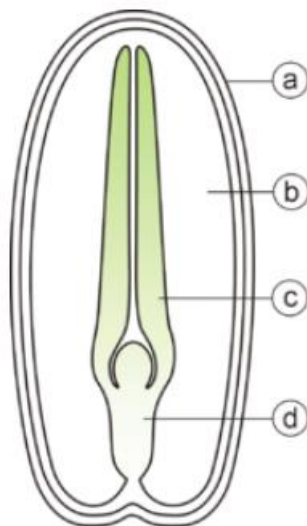
Ravintokuituja analysoidaan gravimetrisesti, ja näin ollen korkea rasvapitoisuus vääristää analyysin tuloksia. Kaikki rasva ei välttämättä suodatu sinttereiden läpi, ja osa taas peseytyy pois asetonin mukana. Ravintokuituanalyysin tulokset vääristyvät, koska ravintokuitupitoisuus lasketaan punnittua näytettä kohden, jossa punnitusvaiheessa on rasva vielä mukana.

Virallisen ravintokuitumenetelmän mukaan rasvan määrä täytyy saada alle 10 %, jotta ravintokuitumäärityksen tuloksista saadaan luotettavia. Ongelmaksi tulee rasvanpoisto-menetelmän valinta. Menetelmä ei saa rikkoa näytettä tai sen sisältämiä ravintokuituja, ja näytteen täytyy riittää vielä ravintokuituanalyysiin. Esimerkiksi Evirassa määritetään rasvan pitoisuus suolahappohydrolyysi- ja liotinuuttosta-menetelmällä. Kyseistä menetelmää ei kuitenkaan voi käyttää pelkästään rasvan poistamiseen, sillä suolahappohydrolyysi saattaa hajottaa osan ravintokuiduista. Lisäksi liotinuuttovaiheessa näyte uutetaan Soxtec-menetelmällä, jossa näyte asetetaan selluloosasta tehtyyn uuttosukkaan. Selluloosa lasketaan ravintokuiduksi, joten sukasta irtoava selluloosa saattaa vääristää ravintokuituanalyysin tuloksia.

3.1 Rasva siemenissä

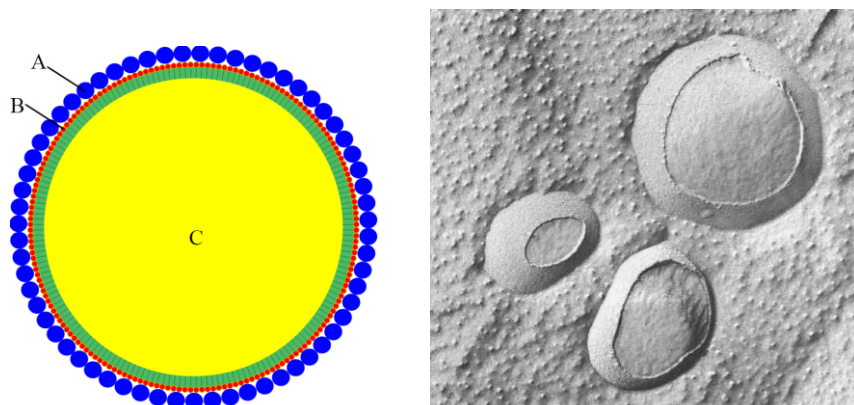
Siemenet sisältävät paljon rasvaa. Esimerkiksi auringonkukansiemenissä rasvapitoisuus voi olla jopa 60 %. Siemenet ovat alkioasteella olevia kasveja, jotka sisältävät kaiken tarvittavan ravinnon kasvien kasvamiseen. Siemenet koostuvat karkeasti kolmesta osasta: Alkiosta, endospermistä ja siemenkuoresta. Alkiossa on valmiina kasvin juurten, verson ja ensimmäisten lehtien aiheet. Endospermi taas ympäröi alkiota ja sisältää itävän kasvin tarvitsevaa ravintoa, kuten proteiiniä, rasvaa ja tärkkelystä. Sie-

menkuori suojaa alkiota ja endospermiä kuivumiselta ja mekaanisilta vaurioilta. Se voi olla joko ohut kerros (esimerkiksi maapähkinä) tai paksu (kookospähkinä).



Kuva 3. Siemenen rakenne. Siemenkuori (a), endospermi (b) ja alkion osia (c ja d).

Kasvien siemenet varastoivat triglyseridin pallon muotoisiin oleosomeihin kasvisolujen sisällä, jotka toimivat ravinto- ja energiavarastoina alkion itämisen ja itämisen jälkeisenä aikana. Kyseisten oleosomien koko vaihtelee eri siemenien mukaan, ja niiden halkaisija on noin 0,5-2,5 μm . Oleosomi koostuu triglyseridytimestä, mitä ympäröi yksikerroksinen fosfolipidikerros, jossa on mukana oleosomeille spesifisiä oleosiineja (kuva 4). Oleosiinit ovat pieniä alkalisia proteiineja, joiden molekyylimassa on 15-26 kDa. [5, 6.] Oleosiinit ja fosfolipidit sisältävät poolisia ja poolittomia osia.



Kuva 4. Oleosomin rakenne ja elektronimikroskooppikuva oleosomista. A = oleosiini proteiineja. B = fosfolipidit. C = triglyseridiydin.[7]

3.2 Rasvan uutto siemenistä

Lipidit ovat suurilta osin poolittomia molekyylejä, joten niiden uuttaminen vaatii poolittoman liuottimen. Siemenien ja niiden sisältämien oleosomien rakenteen vuoksi rasvanpoisto ei kuitenkaan ole niin yksinkertaista. Oleosiinien ja fosfolipidien pooliset päät estävät poolittoman liuottimen pääsyn käsiksi itse rasvamolekyyleihin. Liuottimen estymistä voidaan vähentää esimerkiksi murskaamalla näyte tarpeeksi pieneksi, jolloin sen sisällä olevat membraanit saadaan rikottua ja liuotin pääsee rasvaan käsiksi. Siemenien kohdalla tosin jauhaminen on haasteellista niiden korkean rasvapitoisuuden vuoksi. Siemenet muuttuvat jauhettaessa tahnaksi. Lisäksi, mitä pienempikokoinen siemen on kyseessä, sitä hankalampi sitä on hajottaa tarpeeksi moneen osaan.

Siemenien sisältävät proteiinit voidaan myös rikkoa ja denaturoida suolahappohydrolyysillä, jolloin ne eivät enää häiritse poolisen liuottimen toimintaa. Uutossa voidaan käyttää myös liuotinta, jossa poolisia ja poolittomia molekyylejä, esimerkiksi heksaanin ja isopropanolin seosta. Isopropanoli on tarpeeksi poolinen vaikuttaakseen fosfolipidien ja oleosiinien poolisten päiden kanssa ja näin ollen ”avaamaan” oleosomien ryhmittyneet molekyylit. Isopropanoli on myös tarpeeksi pooliton auttaakseen rasvan uutossa ja liuetukseen heksaaniin. Liuotinuutossa voidaan käyttää myös apuna ultraääntä. Ultraääniavustetussa liuotinuutossa liuottimeen syntyy kavitaatiokuplia. Kavitaatiokuplien hajoaminen nesteessä aiheuttaa ”paineaallon” liuottimessa, joka parantaa sekoittumista ja rikkoo solujen membraaneja. Ultraääni vaikuttaa myös mekaanisesti näytteeseen, parantaen liuottimen pääsyä näytteen sisään. [8.]

Liuotinuutoista jää paljon luonnolle haitallista jätettä, joka täytyy hävittää. Hyvä vaihtoehto liuotinuutoille on rasvan uuttaminen ylikriittisellä fluidilla. Uutto ylikriittisellä fluidilla muistuttaa soxtec-uuttoa, paitsi liuottimen tilalla käytetään ylikriittistä fluidia. Aineiden liukoisuus nousee tiheyden ja paineen mukaan, joten ylikriittisellä fluidilla on korkea absorptiokapasiteetti. Lisäksi se on myös kaasumainen, joten sillä on alhainen viskositeetti. Hiilidioksidi on yleisinkäytetty ylikriittinen fluidi sen alhaisen kriittisen lämpötilan (31 °C) ja kriittisen paineen (74 bar) vuoksi.

4 Kokeellinen osuus

Työn kokeellisessa osiossa kehitettiin rasvanpoistoesikäsittely yli 10 % rasvaa sisältäville näytteille. Tarkoituksena oli lisätä kyseinen esikäsittely Eviran ravintokuitumenetelmään ja näin laajentaa kyseinen menetelmä sisältämään siemenet ja muut rasvaiset näytteet. Rasvanpoiston validointiin näytteiksi valittiin seesaminsiemen ja auringonkukansiemen. Kyseiset näytteet valittiin niiden suuren rasvapitoisuuden (40 - 60 %) ja helpon suodattumisen vuoksi. Lisäksi ravintokuituanalyysissä oli mukana pellavansiemen, jolle oli tehty kyseinen esikäsittely.

Rasvanpoistomenetelmän kehityksessä tarkoituksena oli selvittää, voiko käytetyllä menetelmällä saada luotettavasti rasvaprosentti alle 10 %. Tästä syystä validointiparametrejä olivat toistettavuus, uusittavuus ja oikeellisuus. Rasva päätettiin poistaa petroleetteriutolla. Ennen rasvanpoistomenetelmän validointia tutkittiin eri jauhatuskäsittelyjä siemennäytteille. Lisäksi auringonkukansiemenistä analysoitiin kokonaisrasvan määrä käyttäen suolahappohydrolyysi-liuotinuuttoa. Tulokseksi saatiin 60 %. Seesaminsiemien kohdalla rasvan määrä katsottiin FINELI-tietokannasta, jossa se oli ilmoitettu olevan 58 %.

Kokonaisravintokuitupitoisuuden määrittäminen tehtiin Eviran menetelmällä ”Kokonaisravintokuitupitoisuuden määrittäminen vilja- ja kasvisnäytteistä entsyymaattis-gravimetrisesti ja HPLC-menetelmällä”, joka perustuu viralliseen menetelmään AOAC 2011.25. Kyseisessä menetelmässä näytteestä pilkottiin entsyymaattisesti tärkkelys ja proteiinit, jonka jälkeen näytteestä analysoitiin gravimetrisesti IDF ja SDFP. Gravimetrisen analyysin suodoksesta analysoitiin SDFS HPLC -menetelmällä. Näytteistä tutkittiin myös proteiini- ja tuhkapitoisuudet, joiden määrät vähennettiin kokonaisravintokuitupitoisuudesta.

4.1 Näytteiden esikäsittely

Ennen rasvanpoistoa siemenet jauhettiin. Jauhamiseen kokeiltiin eri jauhatusmyllyjä, kunnes päädyttiin GrindoMix 200 -laitteeseen. Jauhatuksessa kokeiltiin muutamia eri jauhatusaikoja ja -nopeuksia. Auringonkukansiemenellä kokeiltiin ensin 20 sekunnin jauhatusta 500 rpm:llä. Näyte muuttui osittain tahnaksi tällä menetelmällä siemenen

suuren koon ja korkean rasvaprosentin takia. Seuraavaksi kokeiltiin 40 sekunnin jauhausta 500 rpm, jolloin näyte muuttui vielä enemmän tahnaksi. Toisaalta pellavan- ja seesaminsiemenen kohdalla tahnaa ei syntynyt edes 1 minuutin jauhatuksen aikana, koska kyseessä ovat pienikokoiset siemenet. Huomattiin, että ei voida käyttää yhtä jauhatusmenetelmää kaikkien siemenien kohdalla, vaan jokaiselle siemenennäytteelle täytyy valita spesifinen menetelmä. Auringonkukan-, pellavan- ja seesaminsiemenen jauhatusmenetelmät näkyvät taulukossa 2.

Taulukko 2. Jauhatusmenetelmät eri siemenille GrindoMix 200 -laitteella

Näyte	Aika (sek)	Nopeus (rpm)
Auringonkukansiemen	2x20	500
Pellavansiemen	10	1000
Seesaminsiemen	10	1000

4.2 Rasvanpoistomenetelmän kehitys

Rasvanpoistomenetelmän valinnassa päädyttiin petrolieetteri-liuotinuuttoon. Uutettu rasva kerättiin rasvankeräysastialle ja punnittiin.

Reagenssit ja työvälineet:

- petrolieetteri 60 – 80 °C
- rasvankeräysastia
- 50 ml muoviputkia
- sentrifugi
- lämpökaappi
- tasoravistelijä.

Rasvankeräysastiat taarattiin pitämällä niitä 30 min 102 °C:ssa, jonka jälkeen niiden annettiin jäähtyä ja ne punnittiin. Näytteestä punnittiin kuusi 2,000 g rinnakkaisnäytettä muovisiin 50 ml:n sentrifugiputkiin. Niihin lisättiin 30 ml petrolieetteriä, jonka jälkeen ne laitettiin ravistelijaan. Tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin, putkien kaulat huuhdottiin

pienellä määrällä petrolieetteriä ja liuotinfraasi kerättiin rasvankeräysastialle. Liuottimen annettiin haihtua pois, jonka jälkeen astia taarattiin kuten edellä ja punnittiin. Molemmille näytteille kokeiltiin aluksi eri uuttoaikoja, -kertoja ja -liuottimen tilavuuksia. Mikäli uuttoa oli useampi kuin yksi, liuotin dekantoitiin rasvankeräysastiaan jokaisen ravistelun välissä. Eri uuttomenetelmät näkyvät taulukossa 3 ja liitteessä 1.

Siemenet menivät todella hienojakoisiksi partikkeleiksi jauhatuksessa, joka aiheutti ongelmia rasvanpoistossa. Pieni määrä hienojakoista kiinteää ainesta tuli supernatantin mukana rasvankeräysastialle jokaisessa eri uuttomenetelmässä. Tästä syystä ei voitu olla varmoja, antaako analyysi luotettavia tuloksia uutetun rasvan määrästä ja näin ollen rasvanpoiston tehokkuudesta.

Kiinteä näyte huuhdottiin putkien pohjalta petrolieetterillä erilliselle rasvankeräysastialle. Rinnakkaiset näytteet samasta matriisista huuhdottiin samaan astiaan, jotta saatiin tarpeeksi näytettä seuraavaa analyysiä varten. Näytemassan annettiin kuivua yön yli vetokaapissa, jonka jälkeen näytteelle tehtiin rasvapitoisuuden määrittäminen suolahappohydrolyysi-liuotinuutto-menetelmällä.

Uutetuista näytteistä siis analysoitiin vielä rasvapitoisuus akkreditoidulla menetelmällä Evira 8285 (suolahappohydrolyysi-liuotinuutto-menetelmä) todellisen rasvapitoisuuden tarkistamiseksi. Rasvanpoistossa kokeiltiin eri ravisteluajoja, -kertoja ja liuotintilavuuksia (taulukko 3 ja liite 1). Tämän jälkeen näytteille tehtiin rasvanmäärittäminen suolahappohydrolyysi-liuotinuutolla. Menetelmällä, jossa rasva uutettiin kolme kertaa 20 ml:llä petrolieetteriä 1 minuutin vorteksoinnilla, joka toistettiin vielä toisen kerran näytteen kuivuttua (yhteensä 6 uuttoa), saatiin rasvaprosentiksi noin 4 %. Kyseinen menetelmä oli kuitenkin todella paljon aikaa vievä, joten päätettiin yrittää löytää yksinkertaisempi menetelmä. Alustavien tulosten perusteella menetelmä, jossa rasva uutettiin 30 ml:llä petrolieetteriä 3 kertaa 15 minuutin ravistelulla, vaikutti tehokkaimmalta. Kyseistä menetelmää alettiin validoimaan.

Taulukko 3. Esikokeissa testatut liuotinuuttomenetelmät

Luotin/uutto (ml)	Ravistelu-aika (min)	Uuttojen määrä (kpl)	Kokonais liuotintilavuus (ml)	Saanto (%)
40	30	1	40	72
40	30	2	80	84
20	alle 1 min (käsin)	4	80	78
30	15	3	90	81
20	1	6	120	96

4.2.1 Rasvanpoistomenetelmän validointi

Rasvanpoistomenetelmässä validoitiin seuraavat parametrit: toistettavuus, uusittavuus ja oikeellisuus. Toistettavuutta tutkittiin tekemällä rasvanpoistoja auringonkukan- ja seesaminsiemeneistä molemmista 3 rinnakkaisnäytettä samana päivänä. Uusittavuutta taas tutkittiin toistamalla sama kuutena eri päivänä. Oikeellisuus todettiin tässä tapauksessa analysoimalla uutetut näytteet akkreditoidulla suolahappohydrolyysi-liuotinuuttomenetelmällä (Evira 8285).

4.2.2 Tulokset

Rasvanpoistossa saadut tulokset olivat auringonsiemenen kohdalla korkeammat, koska auringonkukansiemenissä on enemmän rasvaa kuin seesaminsiemenissä. Tosin rasvapitoisuuksien ero ei ole kovin suuri. Tuloserot uutoissa kyseisten siemenien kohdalla saattaa johtua niiden rakenteesta. Auringonkukansiemenet ovat paljon suurempia kuin seesaminsiemenet, joten auringonkukansiemenet hajoavat jauhatuksessa pienempiin osiin ja näin ollen voidaan olettaa rasvan uuttuvan paremmin. Rasvanpoiston tulokset näkyvät taulukoissa 4 ja 7.

Taulukko 4. Auringonkukansiemenen rasvanpoiston tulokset. Tuloksista on vähennetty nollanäytteen tulos.

Auringonkukansiemen					
9.6.2015					
	massa (g)	astia (g)	astia+rasva (g)	erotus (g)	rasva-%
1	2,0090	66,4725	67,6027	1,1302	56,17
2	1,9992	59,666	60,7943	1,1283	56,35
3	2,0064	59,7169	60,8468	1,1299	56,23
10.6.2015					
1	1,9977	60,4198	61,5518	1,132	56,50
2	2,0032	64,4001	65,5346	1,1345	56,47
3	2,0050	58,6617	59,8041	1,1424	56,82
11.6.2015					
1	1,9989	61,9515	63,0505	1,099	54,87
2	1,9996	58,6594	59,7733	1,1139	55,59
3	2,0033	61,0227	62,1409	1,1182	55,70
12.6.2015					
1	2,0041	61,8198	62,9405	1,1207	55,82
2	2,0040	57,2358	58,3637	1,1279	56,18
3	1,9987	71,4427	72,5616	1,1189	55,88
16.6.2015					
1	2,0086	58,1391	59,2567	1,1176	55,50
2	2,0061	61,2026	62,3142	1,1116	55,27
3	1,9971	60,6267	61,7268	1,1001	54,94
18.6.2015					
1	2,0025	63,4275	64,5644	1,1369	56,70
2	2,0093	69,5617	70,7292	1,1675	58,04
3	2,0014	63,2386	64,4327	1,1941	59,59

Toistettavuutta tarkastettiin laskemalla päiväkohtaisesti keskihajonta.

Taulukko 5. Auringonkukansiemen keskiarvo ja keskihajonta rasvanpoiston jälkeen jokaisena testipäivänä

Auringonkukansiemen		
	Keskiarvo (%)	Keskihajonta (%)
9.6.2015	56,25	0,09
10.6.2015	56,60	0,19
11.6.2015	55,39	0,45
12.6.2015	55,96	0,19
16.6.2015	55,24	0,28
18.6.2015	58,11	1,45

Viimeisen päivän tulokset ovat hieman suuremmat kuin muut. Uutto oli tehty muuten samalla tavalla kuin muina päivinä, joten voidaan olettaa jonkin virheen tapahtuneen analyysissä. Toistettavuus oli muiden päivien kohdalla hyvä.

Uusittavuutta tarkasteltiin laskemalla kaikkien päivien yhteenlaskettu keskihajonta ja keskiarvo. Viimeisen päivän tulokset päätettiin ottaa mukaan laskuihin. Keskiarvoksi saatiin 56,26 % ja keskihajonnaksi 1,09 %.

Näiden tulosten perusteella jäljelle jäävän rasvan määrä pitäisi olla noin 4 %, mutta suolahappohydrolyysi-liutinuutto-menetelmällä saadut tulokset ovat paljon suuremmat. Saaduista tuloksista huomattiin, että rasvanpoiston tulokset liutinuuttomenetelmällä eivät olleet luotettavia. Esimerkiksi auringonkukansiemenen kohdalla näytti, että rasvanpoiston saanto oli n. 93 %, mutta suolahappohydrolyysi-liutinuutolla huomattiin jäljellä olevan vielä n. 16 % rasvaa: Todellinen saanto oli siis vain 84 %.

Taulukko 6. Suolahappohydrolyysi-liutinuutolla uutettujen näytteiden rasvaprosentit (aurionkukansiemen)

	Utettu	Näyte (g)	Taarapaino (g)	astia+rasva (g)	erotus (g)	Rasva-%
Ak 1	9.6.2015	2,4716	78,767	79,071	0,304	12,30
Ak 2	10.6.2015	2,4469	73,366	73,642	0,276	11,28
Ak 3	11.6.2015	2,4957	76,976	77,328	0,352	14,10
Ak 4	12.6.2015	2,4493	72,900	73,222	0,322	13,15
Ak 5	16.6.2015	2,4858	75,271	75,618	0,347	13,96
Ak 6	18.6.2015	2,4480	60,318	60,625	0,307	12,54

Taulukko 7. Seesaminsiemien rasvanpoiston tulokset. Tuloksista on vähennetty nollanäytteen tulos.

Seesaminsiemien					
9.6.2015					
	massa (g)	astia (g)	astia+rasva (g)	erotus (g)	rasva-%
1	2,0062	62,2702	63,3435	1,0733	53,41
2	2,0058	69,5667	70,6406	1,0739	53,45
3	2,0045	60,2597	61,3289	1,0692	53,25
10.6.2015					
1	2,0026	57,6324	58,723	1,0906	54,30
2	2,0001	61,365	62,4489	1,0839	54,03
3	2,0056	61,8397	62,9297	1,09	54,19
11.6.2015					
1	2,0017	63,4845	64,5355	1,051	52,39
2	2,0081	63,244	64,3002	1,0562	52,48
3	1,9965	63,4331	64,485	1,0519	52,57
12.6.2015					
1	2,0035	57,5619	58,6151	1,0532	52,46
2	2,0032	68,5068	69,5642	1,0574	52,68
3	2,0065	64,4234	65,4829	1,0595	52,70
16.6.2015					
1	2,0038	55,3094	56,3678	1,0584	52,68
2	2,0005	71,9413	72,9954	1,0541	52,55
3	2,0077	60,7478	61,8085	1,0607	52,69
18.6.2015					
1	1,999	58,654	59,7567	1,1027	55,09
2	2,0001	60,2544	61,3717	1,1173	55,79
3	1,9961	63,0502	64,2122	1,162	58,14

Viimeisen päivän tulokset olivat myös seesaminsiemenen kohdalla suuremmat muihin päiviin verrattuna edellä mainituista syistä. Toisaalta keskihajonta oli myös seesaminsiemenen kohdalla hyvin pientä muina päivinä, joten menetelmän toistettavuus voidaan todeta hyväksi.

Taulukko 8. Seesaminsiemenen keskiarvo ja keskihajonta rasvanpoiston jälkeen jokaisena testipäivänä

Seesaminsiemenen		
	Keskiarvo (%)	Keskihajonta (%)
9.6.2015	53,37	0,11
10.6.2015	54,17	0,13
11.6.2015	52,48	0,09
12.6.2015	52,61	0,13
16.6.2015	52,64	0,08
18.6.2015	56,34	1,60

Myös seesaminsiemenen kohdalla viimeisen päivän tulokset otettiin mukaan oikeellisuutta laskiessa. Keskiarvoksi kaikilta päiviltä saatiin 53,60 % ja keskihajonnaksi taas 1,50 %.

Oikeellisuutta tutkittaessa huomattiin, että seesaminsiemeniin jäi hieman enemmän rasvaa uuton jälkeen. Rasvan määrä seesaminsiemeneissä uuton jälkeen oli keskimäärin 14 %.

Taulukko 9. Suolahappohydrolyysi-liuotinuutolla uutettujen näytteiden rasvaprosentit (seesaminsiemeni)

Näyte	Uutettu	Punnittu (g)	Astia (g)	Astia + rasva (g)	Erotus (g)	Rasvan määrä (%)
Se 1	9.6.2015	2,5419	77,142	77,493	0,351	13,81
Se 2	10.6.2015	2,4979	59,569	59,869	0,3	12,01
Se 3	11.6.2015	2,5052	80,612	81,002	0,39	15,57
Se 4	12.6.2015	2,5221	78,685	79,075	0,39	15,46
Se 5	16.6.2015	2,5265	75,592	75,972	0,38	15,04
Se 6	18.6.2015	2,5222	73,106	73,454	0,348	13,80

4.3 Kokonaisravintokuitupitoisuuden määrittäminen

Ravintokuituanalyysissä tehtiin yhteensä 3 kierrosta. Ensimmäisellä kierroksella näytteenä oli auringonkukansiemen, jossa on 4 % rasvaa. Näytteestä tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä. Mukana oli myös kontrollinäytteenä hiivaleipäjauho (3 rinnakkaista) ja vertailunäytteenä galaktaani (2 rinnakkaista). Kierroksella oli mukana 2 nollanäytettä.

Toisella kierroksella oli mukana auringonkukansiemen, jossa on 12 % rasvaa; pellavansiemen, jossa on 16 % rasvaa ja hiivaleipäjauho. Kolmannella kierroksella oli mukana taas seesaminsiemen ja hiivaleipäjauho.

4.3.1 Reagenssit ja laitteet

Analyysissä käytettiin seuraavia reagensseja:

- etanoli 95 %
- etanoli 76 %
- asetoni (reagenssilaatu)
- amyloglukosidaasiliuos (AMG) 3300 U/ml 50 % glyserolissa, Megazyme E-AMGDF, pullo 2 kitissä
- haiman α -amylaasi 150 000 U/g, Megazyme E-PANAA, pullo 1 kitissä
- entsyymiseos, haiman α -amylaasi (50 U/ml) ja AMG (3,4 U/ml)
 - (i) Valmistettiin juuri ennen käyttöä: esimerkiksi 10:lle näytteelle sekoitetaan 0,144 g haiman α -amylaasia 420 ml:aan Na-maleaattipuskuria. Tämän jälkeen lisättiin 0,43 ml AMG:ta
- proteaasi (50 mg/ml. 350 U/ml, 50 % glyserolissa), Megazyme E-BSPRT, pullo 3 kitissä
- Na-maleaattipuskuri (50 mM, pH 6,0, 2 mM CaCl_2 , 0,02 % Na-atsidi)
 - (i) Liuotettiin 11,6 g maleiinihappoa 1600 ml:aan MQ-vettä dekantterilasissa ja säädettiin 4 M:lla NaOH-liuoksella pH 6:een. Lisättiin 0,6 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ja 0,4 g Na-atsidia. Liuos kaadettiin mittapulloon ja täytettiin merkkiin
- trizma-emäs (0,75 M)
- etikkahappo (2 M)

- suolahappo (150 mM)
- HPLC-ajoliuos (50 mg/l Na₂CaEDTA vesiliuos)
- 2 %-Puhdistusliuos (Micro-90)
- Celite (happopesty ja esituhkattu Celite 545, Megazyme G-CEL100).

Analyysissä käytetyt standardi- ja vertailuaineet:

- D-glukoosi LC-standardit (5, 10, 20 mg/ml 0,02 %:ssa Na-atsidissa)
- D-sorbitoli (sisäinen standardi SugarPak-kolonnille, 100 mg/ml 0,02 %:ssa Na-atsidissa)
- LC-retentioaikastandardit (maltodekstriinit ja maltoosi)
 - (i) Oligosakkaridiseosta (Megazyme, pullo 4 kitissä) punnittiin 2,5 g 100 ml mittapulloon ja liuotettiin 80 ml:aan 0,02 % Na-atsidia. Pulloon pipetoitiin 10 ml sisäistä standardia, jonka jälkeen se täytettiin merkkiin asti Na-atsidilla
- galaktaani, vertailunäyte (tuktittava aktiivisuus: pektinaasi; odotettu saanto: ~84 %).

Analyysissä käytetyt laitteet ja välineet:

- jauhatusmylly
- 250 ml Fisherbrand pullo
- 50 ml Pyrex-sintterit, huokoskoko 40-60 µm
- vakuumpumppu, jossa alipaineen säätelymahdollisuus
- sekoittava vesihaude
- vaaka
- lämpökaappi
- eksikaattori

- pH-mittari
- lämpömittari, jossa mittausalue 110 °C
- mekaanisia pipettejä
- muhveliuuni
- Mixed-bed -ioninvaihtopylväät, joissa n. 4 g Amberlite FPA53 (OH⁻) ja Amberlite 200 (H⁺) hartsia
- nestekromatografi kolonniuunilla ja RI-detektorilla
- Guard Pak LC-esikolonne (Waters, no. WAT015209) ja Sugar Pak; 6,5 x 300 mm kolonne (Waters, WAT085188)
- 0,45 µm ruiskusuodattimia
- pyöröhaihdutin.

4.3.2 Analyysin kulku

Sinttereihin punnittiin noin 1 g Celiteä, jonka jälkeen ne vakiopainotettiin 130 °C:ssa yön yli. Sinttereiden annettiin jäähtyä eksikaattorissa tunnin ajan, jonka jälkeen ne punnittiin. Sinttereitä valmistettiin aina kaksinkertainen määrä näytemäärään verrattuna (esimerkiksi 10 näytettä -> 20 sintteriä).

Rasvanpoiston jälkeen näytteiden annettiin kuivua yön yli, jonka jälkeen ne jauhettiin vielä kertaalleen. Ensimmäisellä kierroksella näytteenä oli auringonkukansiemen. Kontrollina oli hiivaleipäjauho ja vertailunäytteenä galaktaani. Galaktaanilla tarkistettiin, ettei entsyymeissä ilmaannu ei-toivottuja aktiivisuuksia. Näytettä ja kontrollia punnittiin $1,000 \pm 0,005$ g / rinnakkaisnäyte. Galaktania punnittiin 0,1 g. Jokaisella kierroksella oli mukana 2 nollanäytettä.

Näytteet lisättiin 250 ml Fisherbrandin lasipulloon, jonka jälkeen niitä kostutettiin 2 ml:a 95 % etanolia. Pulloihin lisättiin 40 ml entsyymiseosta, jonka jälkeen pullot suljettiin. Näytteet laitettiin 150 rpm ravistelevaan vesihauteeseen inkuboitumaan 37 °C:een 16 tunniksi.

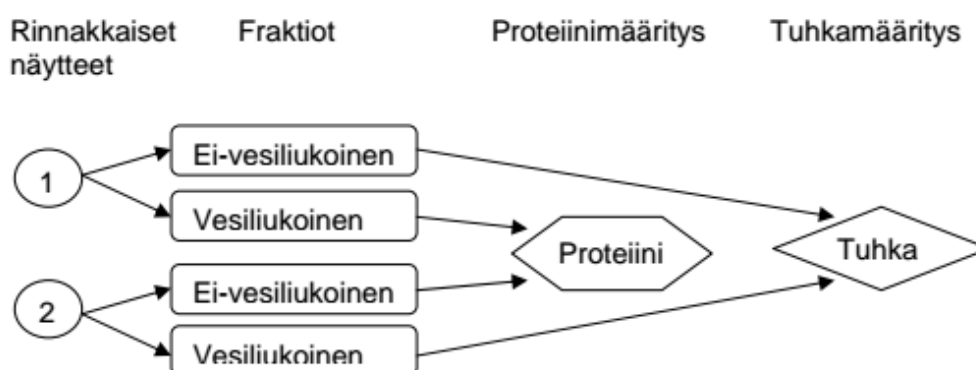
Näytteisiin lisättiin inkuboinnin jälkeen välittömästi 3 ml 0,75 M Trizma-emäsluosta entsyymireaktion lopettamiseksi ja pullot siirrettiin toiseen, 100 °C:seen vesihaute-

seen (ensimmäisen vesihauteen lämpötila säädettiin tässä vaiheessa 60 °C seuraavaa inkubointia varten). Näytepullojen annettiin olla 100 °C:ssa vesihauteessa 20 minuuttia välillä sekoittaen pulloja käsin. Näytteet otettiin pois vesihauteesta ja annettiin jäähtyä n. 60 °C:een lämpötilaan, jonka jälkeen niistä pilkottiin proteiinit lisäämällä 0,1 ml proteaasiliuosta. Proteaasin lisäämisen jälkeen näytteet asetettiin sekoittavaan 60 °C vesihauteeseen, ja niiden annettiin inkuboitua siellä 30 minuuttia. Tässä vaiheessa laitettiin myös 2 litraa MQ-vettä lämpenemään 60 °C:seen. Inkuboinnin jälkeen näytteisiin lisättiin 1 ml D-sorbitoliliuosta sisäiseksi standardiksi.

Näytteistä analysoitiin aluksi veteen liukenematon ravintokuitu (IDF). Esikäsiteltyjen sinttereiden Celite-kerros tasoitettiin ja kostutettiin 15 ml:lla 76 % etanolia. Vakuumin avulla Celite saatiin tiiviisti lasipintaa vasten. Entsyymikäsitellyt näytteet suodatettiin sinttereiden läpi vakuumin avulla. Näytepullot huuhdottiin 60 °C:lla MQ-vedellä, jotta saatiin kaikki näyte kvantitatiivisesti sintteriin. Suodos otettiin talteen seuraavaa suodattusta varten (SDFP). Sinttereissä oleva veteen liukenematon ravintokuitu pestiin kaksi kertaa seuraavasti: 15 ml 76 % etanolia, 15 ml 95 % etanolia ja asetonia. Asetonin annettiin haihtua vetokaapissa, jonka jälkeen sintterit kuivatettiin yön yli 105 °C uunissa. Seuraavana päivänä sinttereiden annettiin jäähtyä noin tunti, jonka jälkeen ne punnittiin.

Suodoksesta analysoitiin vesiliukoinen, etanolilla saostuva ravintokuitu (SDFP). Näytteisiin lisättiin 60 °C:sta 95 % etanolia 290 ml/näyte, jonka jälkeen niitä sekoitettiin kunolla. Näytteiden annettiin saostua tunnin ajan huoneenlämmössä. Tämän jälkeen näytteille tehtiin suodatus kuten edellä. Pullot huuhdottiin tällä kertaa etanolilla, eikä vedellä. Sintterit pestiin samalla tavalla kuin edellä, jonka jälkeen ne laitettiin yön yli uuniin kuivumaan. Seuraavana päivänä sinttereiden annettiin jäähtyä noin tunti, jonka jälkeen ne punnittiin. Suodatuksesta tullut suodos jaettiin kahteen osaan: puolet 200 ml:n pulloon ja puolet 500 ml:n pyöröhaihdutinkolviin HPLC-analyysin esikäsittelyä varten.

Sinttereistä analysoitiin proteiinin ja tuhkan määrä kuvan 4 mukaisesti niin, että saatiin proteiini- ja tuhkamäärät IDF- ja SDFP-fraktioista. Mikäli mukana oli kolmas rinnakkaisnäyte, jäi se ylimääräiseksi. Ylimääräisiä sinttereitä voitiin käyttää, mikäli proteiini- tai tuhkamäärityksissä meni jokin vikaan.



Kuva 5. Tuhka- ja proteiinimääritykset rinnakkaisista näytteistä [9].

Proteiinipitoisuus määritettiin Kjeldahl-menetelmällä. Sintterit tyhjennettiin Kjeldahl-putkiin ja niille tehtiin märkäpoltto. Putkiin lisättiin 2 Kjeltabsia ja 16 ml rikkihappoa, jonka jälkeen ne lämmitettiin 425 °C lämpötilaan. Putkien annettiin olla kyseisessä lämpötilassa 2 tuntia 51 minuuttia, jonka jälkeen ne jäähdytettiin 250 °C. Kjeldahl-putkiin lisättiin 30 ml MQ-vettä. Tämän jälkeen näytteet analysoitiin FOSS Kjeltec 8400 Kjeldahl Auto Sampler Analyzer Unit -laitteella.

Tuhkan määrittäminen tehtiin laittamalla sintterit 5 tunniksi 525 °C muhveliuuniin, jonka jälkeen ne jäähdytettiin ja punnittiin.

SDFP:n suodatukselta tulleesta suodoksesta haihdutettiin etanoli pois pyöröhaihduttimella, jonka jälkeen näytteisiin lisättiin 5 ml 150 mM suolahappoa. Kolvaa pyöriteltiin noin 2 minuuttia ja näytteet kaadettiin polypropyleeniputkiin. Putkiin lisättiin 0,1 ml AMG-liuosta ja niiden annettiin inkuboitua 1 tunti 60 °C:ssa vesihauteessa. Reaktio päätettiin vielä inkuboimalla näytteitä 100 °C:ssa 5 minuutin ajan. Tässä vaiheessa näytteille tehtiin de-ionisointi käyttäen valmiiksi Amberlite OH⁻ ja H⁺ hartseilla täytettyjä Bio-Rad ioninvaihtokolonneja. Ioninvaihtojen jälkeen näytteet suodatettiin 1 ml kerta-käyttörüiskuilla, joissa oli kiinnitettynä 0,45 µm huokoskoon omaava suodatin.

HPLC-ajoliuoksena toimi 50 mg/l Na₂CaEDTA-vesiliuos. Kolonniuunin lämpötila oli 90 °C ja virtausnopeus 0,50 ml/min. RI-detektorin lämpötila oli 50 °C ja injektiotilavuus 50 µl.

4.3.3 Tulosten laskeminen

Nollanäytteiden tulokset laskettiin kaavalla 1. Rinnakkaisista tuloksista (BR_1 ja BR_2) otettiin keskiarvo, josta taas vähennettiin tuhkan (A_B) ja proteiinin (P_B) määrä.

$$(1) \quad Blank, B \text{ (mg)} = \frac{BR_1 + BR_2}{2} - P_B - A_B$$

Mikäli nollanäytteen tulokseksi tuli negatiivinen, se pyöristettiin nolnaan. IDF- ja SDFP-tulokset laskettiin kaavan 2 mukaan laskemalla keskiarvo rinnakkaisten tulosten jäänösten painoista (R_1 , R_2 ja R_3). Kyseisestä keskiarvosta vähennettiin nollanäyte (B), tuhka (A) ja proteiini (P). Tulos jaettiin vielä punnittujen rinnakkaisnäytteiden massoilla (M_1 , M_2 ja M_3), jolloin saatiin näytteen suhteellinen ravintokuitupitoisuus.

$$(2) \quad IDF \text{ ja SDFP (mg/100g)} = \frac{[(R_1 + R_2 + R_3)/3] - P - A - B}{(M_1 + M_2 + M_3)/3} * 100$$

HPLC-näytteille laskettiin ensin vastekerroin kaavan 3 mukaan. Sisäisen standardin piikin pinta-ala (PA_{IS}) jaettiin D-glukoosin piikin pinta-alalla (PA_{Glc}), ja tulos kerrottiin D-glukoosin massalla standardissa (Wt_{Glc}). Tämä tulos vielä jaettiin sisäisen standardin massalla (Wt_{IS}), jolloin saatiin vastekerroin R_f .

$$(3) \quad Vastekerroin, R_f = \frac{\frac{PA_{IS}}{PA_{Glc}} * Wt_{Glc}}{Wt_{IS}}$$

Tämän jälkeen lyhytketjuiset ravintokuidut (SDFS) laskettiin kaavalla 4. R_f on kaavalla 3 laskettu vastekerroin. Wt_{IS_SAMP} on näytteeseen lisätyn sisäisen standardin paino ja M taas näytteen alkuperäinen paino. PA_{SDFS} on lyhytketjuisten ravintokuitujen yhteenlaskettu pinta-ala ja PA_{IS_SAMP} taas sisäisen standardin piikin pinta-ala.

$$(3) \quad SDFS = (R_f * Wt_{IS_SAMP} * \frac{PA_{SDFS}}{PA_{IS_SAMP}} * 100) / M$$

Kokonaisravintokuitupitoisuus saatiin laskemalla IDF, SDFP ja SDFS yhteen.

4.3.4 Ravintokuituanalyysin tulokset

Ensimmäisellä kierroksella näytteinä olivat auringonkukansiemen (rasvaa 4 %), hiivaleipäjauho (kontrolli) ja galaktaani (vertailunäyte). Hiivaleipäjauhon tulokset olivat samaa luokkaa aikaisempien tulosten kanssa, joten voidaan todeta, että kierros onnistui. Galaktaanin saantoprosentiksi saatiin 88 %, joka vastaa työohjeessa mainittuja arvoja.

Taulukko 10. Ensimmäisen kierroksen kokonaisravintokuitupitoisuudet uutetuista näytteistä

Auringonkukansiemen		
Fraktio	Ravintokuidun määrä	Ravintokuidun määrä
	mg/100g	% w/w
IDF	22023	22,02
SDFP	3051	3,05
SDFS	1322	1,32
Total DF	26396	26,40
Hiivaleipäjauho		
Fraktio	Ravintokuidun määrä	Ravintokuidun määrä
	mg/100g	% w/w
IDF	2267	2,27
SDFP	2000	2,00
SDFS	1743	1,74
Total DF	6010	6,01
Galaktaani		
Fraktio	Ravintokuidun määrä	Ravintokuidun määrä
	mg/100g	% w/w
IDF	0	0
SDFP	91846	91,85
SDFS	3864	3,86
Total DF	95103	95,10

Toisella kierroksella näytteinä olivat auringonkukansiemen (rasvaa noin 12 %), pellavansiemen ja hiivaleipäjauho. Auringonkukansiemenen tulos oli tällä kierroksella saman verran ensimmäisen kierroksen tuloksen kanssa, vaikka teoriassa sen pitäisi olla hieman pienempi näytteen suuremman rasvapitoisuuden takia. Toisaalta hiivaleipäjauhon tulos oli myös tällä kierroksella hieman suurempi kuin ensimmäisellä, joten auringonkukansiementen tulosten samanlaisuus saattaa johtua siitä.

Taulukko 11. Toisen kierroksen kokonaisravintokuitupitoisuudet uutetuista näytteistä

Auringonkukansiemen HKEM-3755		
Fraktio	Ravintokuidun määrä	Ravintokuidun määrä
	mg/100g	% w/w
IDF	22591	22,591
SDFP	2334	2,334
SDFS	1127	1,127
Total DF	26051	26,051
Pellavansiemen HKEM-3756		
Fraktio	Ravintokuidun määrä	Ravintokuidun määrä
	mg/100g	% w/w
IDF	37124	37,124
SDFP	1339	1,339
SDFS	663	0,663
Total DF	39126	39,126
Hiivaleipäjauho HKEM-3691		
Fraktio	Ravintokuidun määrä	Ravintokuidun määrä
	mg/100g	% w/w
IDF	2609	2,609
SDFP	2659	2,659
SDFS	1573	1,573
Total DF	6840	6,84

Kolmannella kierroksella näytteinä olivat seesaminsiemen ja hiivaleipäjauho. Hiivaleipäjauhon tulos kolmannella kierroksella oli samaa luokkaa ensimmäisen kierroksen tuloksen kanssa.

Taulukko 12. Kolmannen kierroksen kokonaisravintokuitupitoisuudet uutetuista näytteistä

Seesaminsien		
Fraktio	Ravintokuidun määrä (mg/100g)	Ravintokuidun määrä (%w/w)
IDF	24564	24,564
SDFP	2988	2,988
SDFS	3712	3,712
Total DF	31264	31,264
Hiivaleipäjauho		
Fraktio	Ravintokuidun määrä (mg/100g)	Ravintokuidun määrä (%w/w)
IDF	2518	2,518
SDFP	1662	1,662
SDFS	1730	1,73
Total DF	5910	5,91

Näytteistä laskettiin vielä kokonaisravintokuitupitoisuus tuorepainoa kohden lisäämällä poistetun rasvan määrä tuloksiin. Yhteenveto tuloksista ja uutetusta rasvasta näkyy taulukossa 13.

Taulukko 13. Kokonaisravintokuitupitoisuudet näytteiden tuorepainosta

Näyte	Ravintokuitu (%)	Uutettu rasva (%)	Kokonaisravintokuitu (%)
Auringonkukansiemen (kaupasta)	26,40	61,30	10,22
Auringonkukansiemen (kokoomanäyte)	26,05	56,42	11,35
Pellavansiemen	39,13	53,34	18,26
Seesaminsien	31,26	32,19	21,20

Tuloksia vertailtiin elintarvikkeiden koostumustietokanta Finelin tuloksiin. Auringonkukan- ja seesaminsienemen kohdalla Finelissä ilmoitettu arvo on alhaisempi kuin analyysissä saatu tulos. Auringonkukansiemenelle on ilmoitettu kokonaisravintokuitupitoisuudeksi 6,0 % ja seesaminsienemenelle 12,3 %. Kyseiset tulokset on otettu elintarvikekoostumustaulukosta: "Livsmedelstabell Energi och näringsämnen, 1996". Pellavansiemenen kohdalla analyysissä saatu tulos on alhaisempi kuin Finelissä ilmoitettu tulos (26,4 %). Kyseinen tulos on tullut riippumattomalta laboratoriolta.

5 Yhteenveto

Tuloksista huomataan, että kyseisellä uutolla rasvaprosenttia ei saatu alle 10 %:in. Erot seesaminsiemenen ja auringonkukansiemenen rasvanpoistotuloksien välillä voidaan selittää kyseisten siementen rakenne-eroilla. Seesaminsiemen koko on paljon pienempi kuin auringonkukansiemenen, jolloin jauhatuksessa yksittäiset siemenet eivät rikkoutu niin moneen osaan kuin auringonkukansiemenet. Rasvaa saattaa mahdollisesti jäädä vielä siemenfragmenttien endospermiin. Liutinuuttomenetelmän vääristyneet tulokset voidaan mahdollisesti myös liittää siemenien rakenteeseen. Rasvat ovat siemenien sisällä oleosomeissa, joissa on poolittomia ja poolisia osia. Petrolieetterin on hankalampi päästä vuorovaikutukseen rasvojen poolittomien osien kanssa, koska oleosomien sisältämät fosfolipidit ja oleosiiniproteiinit estävät sen. Toisaalta fosfolipideissä ja oleosiineissa on myös poolittomia osia, jolloin ne saattavat tulla petrolieetterin mukana rasvankeräysastialle.

Siementen korkean rasvapitoisuuden vuoksi pitkäaikainen tai seulan läpi jauhaminen muuttaa siemenet tahnaksi, jota taas on vaikea käsitellä. Tästä syystä siemenet jauheetaan 0,5 mm seulan läpi vasta, kun rasvanpoisto on suoritettu.

Auringonkukansiemenen tuloserot ravintokuituanalyyseissä kierrosten 1 ja 2 välillä ovat hyvin pienet.. Hiivaleipäjauhon (kontrollinäyte) tulos oli myös suurempi toisella kierroksella. Toisaalta myös eri kierroksilla oli eri auringonkukansiemennäytteet: Ensimmäisellä kierroksella oli kaupasta ostettu auringonkukansiemenpussi, kun taas toisen kierroksen auringonkukansiemen oli tullilaboratoriosta saatu useasta osanäytteestä koostettu kokoomanäyte.

Tuloksista huomataan, että auringonkukansiemenen kohdalla 4 %:in tai 12 %:in rasvapitoisuudet eivät vaikuttaneet tulokseen merkittävästi. Virallisen ravintokuitumenetelmän tavoitteena on kuitenkin alle 10 %:in rasvapitoisuus. Tästä syystä rasvanpoiston kohdalla voidaan jatkaa vielä tutkimuksia, jotta menetelmä saadaan luotettavaksi myös siemennäytteille. Menetelmän 6 x 20 ml 1 minuutin uutolla tuloksista voidaan päätellä, että rasvaa saadaan poistettua enemmän lisäämällä uuttokertoja. Saadut ravintokuitutulokset siementen kohdalla tullaan julkaisemaan elintarvikkeiden koostumustietokanta Finelissä.

Lähteet

- 1 Brunt K. & Sanders P. 2012. Improvement of the AOAC 2009.01 total dietary fibre method for bread and other high starch containing matrices. Artikkel.
- 2 Kendall Cyril WC, Esfahani Amin, Jenkins David JA, 2009. The link between dietary fibre and human health. Artikkel.
- 3 Megazyme International Ireland, 2013. Integrated total dietary fibre assay procedure. Työohje.
- 4 Sigma-Aldrich. Enzymatic Food Analysis. Verkkodokumentti. Luettu 19.11.2015.
- 5 Anthony H.C. Huang, 1996. Oleosins and Oil Bodies in Seeds and Other Organs. Plant Physiol.
- 6 Tzen Jason T. C., Cao Yi-zhi, Laurent Pascal, Ratnayake Chandra, Huang Anthony H. C., 1993. Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species. Plant Physiol.
- 7 Slack Charles R., Bertaud William S., Shaw Brian D., Holland Ross, Browse John, Wright Heather, 1980. Some studies on the composition and surface properties of oil bodies from the seed cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius*) and linseed (*Linum mustatissimum*). Artikkel.
- 8 Paniwnyk L., Beaufoy E. Beaufoy, Lorimer J.P., Mason T.J., 2009. Ultrason. Sonochem. 8.
- 9 Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, 2014. Kokonaisravintokuitupitoisuuden määrittäminen vilja- ja kasvisnäytteistä entsymaattis-gravimetrisesti ja HPLCmenetelmällä. Työohje.
- 10 Westenbrink, S., Brunt, K., van der Kamp, J 2012. Dietary fibre: Challenges in production and use of food composition data, Food Chemistry: Artikkel.
- 11 McCleary Barry V. An integrated procedure for the measurement of total dietary fibre (including resistant starch), non-digestible oligosaccharides and available carbohydrates. BioanalChem (2007).

- 12 Zielinski Garret, Rozema Brent, 2013. Review of fiber methods and applicability to fortified foods and supplements: choosing the correct method and interpreting results. Artikkel.
- 13 Taha Ameer Y., Metharel Adam H., Stark Ken D., 2012. Comparative analysis of standardised and common modifications of methods for lipid extraction for the determination of fatty acids. Artikkel.

Rasvauuton eri menetelmät ja tulokset

Näyte	Päivämäärä	Punnitus	Uutto-	Astia	Astia +	Erotus	Tulos
Auringonkukan- siemen		(g)	menetelmä	(g)	Rasva (g)	(g)	(%)
1	1.4.2015	2,0033		58,5166	59,6577	1,1411	57,0
2	1.4.2015	2,0638		71,4688	72,6370	1,1682	56,6
3	1.4.2015	2,0512		61,9826	63,1557	1,1731	57,2
4	1.4.2015	2,0006		55,3381	56,4740	1,1359	56,8
5	1.4.2015	2,0181		66,6864	67,8342	1,1478	56,9
6	1.4.2015	2,0000		60,4494	61,5880	1,1386	56,9
7	2.4.2015	4,8560		58,6934	58,9067	0,2133	4,4
Pellavansiemen							
1	7.4.2015	2,0088		59,7489	60,3688	0,6199	30,9
2	7.4.2015	2,0300		60,6433	61,2845	0,6412	31,6
3	7.4.2015	2,0234		62,2932	62,9014	0,6082	30,1
4	7.4.2015	2,0484		64,4300	65,0497	0,6197	30,3
5	7.4.2015	2,0340		71,9454	72,5740	0,6286	30,9
6	7.4.2015	2,0237		69,5992	70,2138	0,6146	30,4
Auringonkukan- siemen							
1	21.4.2015	1,9993		57,258	58,2732	1,0152	50,66
2	21.4.2015	2,0178		63,4511	64,4732	1,0221	50,54
3	21.4.2015	1,9991		58,8808	59,8928	1,0120	50,50
0	21.4.2015	-		58,6877	58,6901	0,0024	-
4	21.4.2015	2,0077		60,2863	61,4302	1,1439	56,85
5	21.4.2015	2,05		58,689	59,852	1,1630	56,60
6	21.4.2015	2,0258		61,0437	62,2007	1,1570	56,98
0	21.4.2015	-		62,288	62,2906	0,0026	-
Auringonkukan- siemen							
1	22.4.2015	2,005		64,6884	65,6847	0,9963	49,57
2	22.4.2015	2,004		57,6568	58,6653	1,0085	50,20
3	22.4.2015	2,0063		63,9816	64,9852	1,0036	49,90
0	22.4.2015	-		61,9743	61,9767	0,0024	-

Auringonkukan siemen							
1	24.4.2015	2,0769		71,4606	72,6216	1,161	55,85
2	24.4.2015	2,0008		66,6782	67,6791	1,0009	49,97
3	24.4.2015	1,9943		64,4255	65,4318	1,0063	50,40
0	24.4.2015			55,3339	55,335	0,0011	-
Auringonkukan siemen							
0	27.4.2015			58,6837	58,6852	0,0015	-
1	27.4.2015	2,0483		57,6525	58,806	1,1535	56,24
2	27.4.2015	2,0124		59,0297	60,1644	1,1347	56,31
3	27.4.2015	2,0098		59,7409	60,8645	1,1236	55,83
0	27.4.2015			60,2828	60,2844	0,0016	-
4	27.4.2015	2,0312		60,6354	61,7144	1,079	53,04
5	27.4.2015	2,0142		64,0776	65,1496	1,072	53,14
6	27.4.2015	2,0538		62,09	63,1868	1,0968	53,32
Auringonkukan siemen							
1	27.4.2015	2,0022		66,3513	67,4238	1,0725	53,49
2	27.4.2015	2,0054		58,6855	59,7608	1,0753	53,55
3	27.4.2015	2,0017		63,9775	65,0567	1,0792	53,84
4	27.4.2015	2,0071		60,4404	61,5081	1,0677	53,12
5	27.4.2015	1,9916		61,0408	62,0945	1,0537	52,83
6	27.4.2015	2,0045		63,0796	64,1399	1,0603	52,82
Auringonkukan siemen							
1	28.4.2015	1,9974		64,6843	65,8155	1,1312	56,56
2	28.4.2015	2,0034		61,97	63,1048	1,1348	56,57
3	28.4.2015	1,9955		64,1501	65,2854	1,1353	56,82
4	28.4.2015	2,004		61,2147	62,3479	1,1332	56,47
5	28.4.2015	2,0011		57,2548	58,3983	1,1435	57,07
6	28.4.2015	2,0041		58,8771	60,0177	1,1406	56,84
Pellavansiemen							
1	4.5.2015	2,0001		61,216	61,8632	0,6472	32,27
2	4.5.2015	2,0048		60,4364	61,0832	0,6468	32,18
3	4.5.2015	2,0163		57,2498	57,9016	0,6518	32,24
4	4.5.2015	1,9947		61,8548	62,5003	0,6455	32,28
5	4.5.2015	2,0088		63,9724	64,616	0,6436	31,95
6	4.5.2015	2,0097		66,4829	67,1317	0,6488	32,20
0	4.5.2015			66,3473	66,3488	0,0015	
0	4.5.2015			58,6809	58,6828	0,0019	

Seesaminsien							
1	7.5.2015	2,0051		64,4208	65,4667	1,0459	52,08
2	7.5.2015	2,0055		59,0258	60,0635	1,0377	51,66
3	7.5.2015	2,0088		58,8727	59,9238	1,0511	52,24
4	7.5.2015	2,0066		58,6796	59,7372	1,0576	52,62
5	7.5.2015	2,0036		57,6481	58,6772	1,0291	51,28
6	7.5.2015	2,0024		61,3782	62,4105	1,0323	51,47
Seesaminsien							
1	8.5.2015	1,9962		59,7368	60,6995	0,9627	48,19
2	8.5.2015	2,0005		64,6801	65,654	0,9739	48,64
3	8.5.2015	2,0058		69,5865	70,5688	0,9823	48,93
0	8.5.2015			55,3292	55,33	0,0008	
4	8.5.2015	2,0142		63,0751	64,0582	0,9831	48,77
5	8.5.2015	2,0171		59,7011	60,6885	0,9874	48,91
6	8.5.2015	2,0207		66,6746	67,649	0,9744	48,18

Seesaminsien

1	13.5.2015	2,0041		71,4517	72,4497	0,998	49,70
2	13.5.2015	2,0042		66,3425	67,3443	1,0018	49,89
3	13.5.2015	2,0012		59,0207	60,0227	1,002	50,01
0	13.5.2015			64,4157	64,4168	0,0011	

Auringonkukan siemen HKEM-3755

1	15.5.2015	2,0018		64,6745	65,7297	1,0552	52,63
2	15.5.2015	2,0087		61,0308	62,0863	1,0555	52,46
3	15.5.2015	2,0035		60,2734	61,3264	1,053	52,47
4	15.5.2015	2,0097		69,5814	70,639	1,0576	52,54
5	15.5.2015	1,9995		59,7315	60,7869	1,0554	52,70
6	15.5.2015	2,0058		58,6758	59,7322	1,0564	52,58













Pellavansiemen HKEM-3756

1	15.5.2015	2,0011		61,8285	62,4994	0,6709	33,44
2	15.5.2015	2,0028		58,8672	59,5431	0,6759	33,66
3	15.5.2015	2,0002		63,9671	64,6268	0,6597	32,90
4	15.5.2015	2,0068		63,0698	63,7262	0,6564	32,62
5	15.5.2015	2,0062		61,3801	62,0346	0,6545	32,54
6	15.5.2015	2,0039		55,3235	56,0238	0,7003	34,86

**Seesaminsien
HKEM-3757**

1	1.6.2015	2,0221		58,1437	59,2364	1,0927	53,95
2	1.6.2015	2,0083		60,6309	61,7212	1,0903	54,21
3	1.6.2015	2,0195		61,2068	62,3044	1,0976	54,27
4	1.6.2015	2,0281		64,0735	65,167	1,0935	53,83
5	1.6.2015	2,0184		64,1451	65,2368	1,0917	54,00
6	1.6.2015	2,0167		62,0858	63,1763	1,0905	53,99

Menetelmät:

-  20 ml/1h ravistelussa
-  2x 20 ml/30 min ravistelussa
-  20 ml/30 min ravistelussa
-  3x 20 ml vorteksoitu 1 min
-  2x 3 x 20 ml vorteksoitu 1 min
-  20 ml/ 30 min ravistelu, ja 20 ml "huuhtelu" (ei ravistelua)
-  20 ml/30 min ravistelu + 20 ml ja nopea ravistelu
-  40 ml/ 30 min ravistelu
-  2 x 40 ml/ 30 min ravistelu
-  4x 20 ml / käsin ravistelu
-  5x 20 ml/ käsin ravistelu
-  3x 30 ml/ 15 min ravistelu

HPLC-analyysin piikkien pinta-alat

Kierros 1

Näyte	Oligosak- karidit 2	Oligosak- karidit	Oligosak- karidit 3	Oligosak- karidit 4	Disak- karidit	Glu- koosi	Sorbi- toli
Auringon- kukka 1	52555	330377	45376	232445	145917 3	352789	26468 41
Auringon- kukka 2	65284	336937	42893	228760	139126 1	338145	24552 07
Auringon- kukka 3	24295	331002	45639	212597	138577 5	363365	29823 76
Hiivaleipä- jauho 1	372734	600124	56824	170566	312811	219642 18	34158 13
Hiivaleipä- jauho 2	454724	721718	68380	198614	361187	925286 8	40609 14
Hiivaleipä- jauho 3	338872	558870	40235	179763	348194	100276 31	40607 93
Galaktaani 1	188926	188926				19004	52377 18
Galaktaani 2	136533	156206		19673	11415	18096	40740 11
Blank	114404	114404			52070	14852	46122 44
Blank	202820	202820			13454	16217	49865 03

Kierros 2

Näyte	Oligosak- karidit 2	Oligosak- karidit group	Oligosak- karidit 3	Oligosak- karidit 4	Disak- karidit	Glu- koosi	Sorbi- toli
Auringon- kukka 1		471018	54630	365948	258880 1	11716	45669 00
Auringon- kukka 2	56811	491658	54174	380673	263942 9	13055	46400 85
Auringon- kukka 3		486364	58545	363818	254203 9	12498	44103 91
Pellavan- siemen 1	81287	232128	19558	131284	722040	6221	37607 99
Pellavan- siemen 2		311457	11928	241711	749737	23418	45525 67
Pellavan- siemen 3		230256	19372	140265	768631	9287	40001 45
Hiiivaleipä- jauho 1		518395	42270	164906	318256	23744 659	41415 09
Hiiivaleipä- jauho 2	475156	736278	67263	193859	360246	24482 778	43029 91
Blank	184187	184187				7436	17180 45
Blank	177594	177594				19220	41243 77

Kierros 3

Näyte	Oligosak- karidit group	Oligosak- karidit 2	Oligosak- karidit 3	Oligosak- karidit 4	Disak- karidit	Glu- koosi	Sorbi- toli
Seesamin- siemen 1	1574259	68021	119195	1370567	559020	27760 3	44369 41
Seesamin- siemen 2	1383102	58874	104405	1205693	495218	28689 9	39129 20
seesamin- siemen 3	1290576	72496	102789	1096529	453444	26174 8	38259 87
Merilevä 1	165271	165271			26181	30235 0	43573 62
Merilevä 2	111760	21920	10730	4859	13051	33973 1	48046 69
Merilevä3	167674	167674			25229	26732 8	39016 69
Hiiivaleipä- jauho 1	588247	369929	48691	169626	318954	86869 38	36764 10
Hiiivaleipä- jauho 2	648749	409133	54731	184884	343006	94613 29	39127 04
Blank	203037					16533	34544 94
Blank	213870			64483		16165	34821 93

HPLC kalibrointiliuokset

Kierros 1

Näyte	Glukoosi	Sorbitoli
A Glc 5mg/ml + sorb 210415 iko	3163361	6636117
B Glc 5mg/ml + sorb 210415 iko	3165996	6653696
C Glc 5mg/ml + sorb 210415 iko	3161870	6643962
A Glc 10mg/ml + sorb 210415 iko	6170532	6570997
B Glc 10mg/ml + sorb 210415 iko	6174946	6583443
C Glc 10mg/ml + sorb 210415 iko	6163946	6563012
A Glc 20mg/ml + sorb 210415 iko	12186333	6646448
B Glc 20mg/ml + sorb 210415 iko	12171317	6621035
C Glc 20mg/ml + sorb 210415 iko	12205758	6640419

Kierros 2

Näyte	Glukoosi	Sorbitoli
A Glc 5mg/ml 270515 JLa	3108862	6488029
B Glc 5mg/ml 270515 JLa	3114828	6490725
C Glc 5mg/ml 270515 JLa	3111998	6496745
A Glc 10mg/ml 270515 JLa	6154041	6568937
A Glc 10mg/ml 270515 JLa	6165261	6590001
C Glc 10mg/ml 270515 JLa	6156409	6572542
A Glc 20mg/ml 270515 JLa	12231592	6588784
B Glc 20mg/ml 270515 JLa	12244010	6583635
C Glc 20mg/ml 270515 JLa	12233048	6584852

Kierros 3

Näyte	Glukoosi	Sorbitoli
A Glc 5mg/ml 100615 JLa	5751174	11982206
B Glc 5mg/ml 100615 JLa	6714102	13934486
C Glc 5mg/ml 100615 JLa	6668553	13880745
A Glc 10mg/ml 100615 JLa	10461514	11145047
B Glc 10mg/ml 100615 JLa	9158651	9767143
C Glc 10mg/ml 100615 JLa	11278290	12026269
A Glc 20mg/ml 100615 JLa	17795888	9747170
B Glc 20mg/ml 100615 JLa	19802878	11053216
C Glc 20mg/ml 100615 JLa	19041565	10525820